

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2005年10月6日 (06.10.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/093412 A1

(51) 国際特許分類?: G01N 33/50, C12Q 1/26

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006429

(22) 国際出願日: 2005年3月25日 (25.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-089063 2004年3月25日 (25.03.2004) JP
特願2004-255976 2004年9月2日 (02.09.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社フューエンス (FUENCE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1500012 東京都渋谷区広尾1-11-2 AIOS広尾ビル703号 Tokyo (JP).

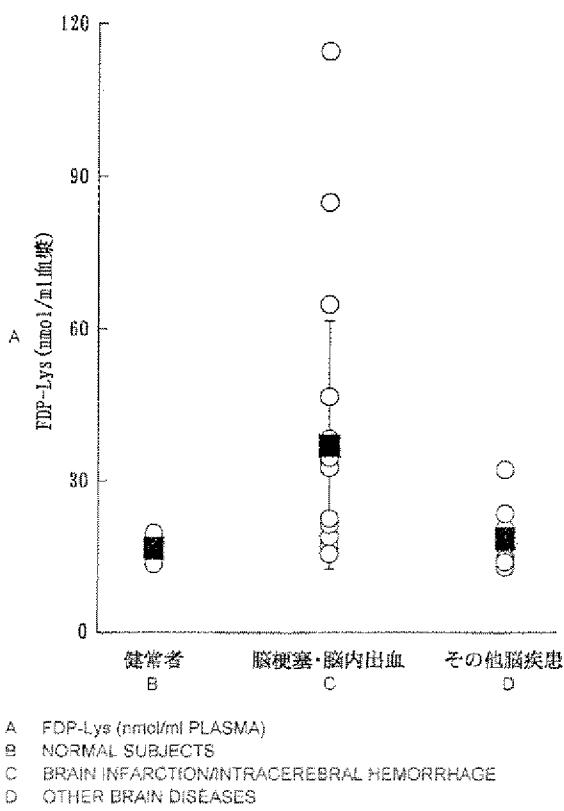
(71) 出願人および
(72) 発明者: 五十嵐一衛 (IGARASHI, Kazuei) [JP/JP]; 〒2720033 千葉県市川市市川南3-12C-1102 Chiba (JP).

(72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 上田志朗 (UEDA, Shiro) [JP/JP]; 〒2600851 千葉県千葉市中央区矢作町497-49 Chiba (JP). 佐伯直勝 (SAEKI, Naokatsu) [JP/JP]; 〒2600041 千葉県千葉市中央区東千葉3-11-5 Chiba (JP). 柏木敬子 (KASHIWAGI, Keiko) [JP/JP]; 〒2610001 千葉県千葉市美浜区幸町1-1-1-1805 Chiba (JP). 富取秀行 (TOMITORI, Hideyuki) [JP/JP]; 〒2640031 千葉市美浜区幸町1-1-1-1805 Chiba (JP).

/続葉有)

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING APOPLECTIC STROKE/ASYMPTOMATIC BRAIN INFARCTION USING POLYAMINE AND ACROLEIN CONTENTS, POLYAMINE OXIDASE ACTIVITY OR PROTEIN CONTENT THEREOF AS INDICATION

(54) 発明の名称: ポリアミン、アクロレインの含有量又はポリアミンオキシダーゼ活性又はその蛋白質量を指標とした脳卒中・無症候性脳梗塞の診断方法



(57) Abstract: It is intended to provide a method of diagnosing apoplectic stroke/asymptomatic brain infarction and screening patients with apoplectic stroke/asymptomatic brain infarction by measuring the acrolein content, the polyamine content, the polyamine oxidase activity or the content of polyamine oxidase protein in the plasma. This finding suggests that inhibition of polyamine oxidase would contribute to the prevention of apoplectic stroke/asymptomatic brain infarction or the halt of the progression of pathological conditions thereof and that a remedy for apoplectic stroke/asymptomatic brain infarction would be obtained by searching for a compound inhibiting polyamine oxidase.

(57) 要約: 本発明により、血漿中のアクロレイン含有量、ポリアミン含有量、あるいはポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼ蛋白質量の測定を行なうことからなる、脳卒中・無症候性脳梗塞の診断及び、脳卒中・無症候性脳梗塞患者のスクリーニングを行なう方法が提供された。本発明の知見は、ポリアミンオキシダーゼを阻害することにより脳卒中・無症候性脳梗塞を予防したり、病状の進捗を阻止することができる可能性や、ポリアミンオキシダーゼを阻害する化合物を探索することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の治療薬を得ることができる可能性を示唆するものである。

WO 2005/093412 A1



葉県千葉市若葉区愛生町57-5 ワンダーランド
207号 Chiba (JP).

(74) 代理人: 杉村 興作 (SUGIMURA, Kosaku); 〒1000043
東京都千代田区霞が関3丁目2番4号 霞山ビルディ
ング 7F Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

ポリアミン、アクロレインの含有量又はポリアミンオキシダーゼ活性又はその蛋白質量を指標とした脳卒中・無症候性脳梗塞の診断方法

技術分野

本発明は、ポリアミン、アクロレインの含有量又はポリアミンオキシダーゼ活性又はその蛋白質量を指標とした脳卒中・無症候性脳梗塞の診断方法に関する。更に本発明は、ポリアミン、アクロレインの含有量又はポリアミンオキシダーゼ活性又はその蛋白質量を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

脳血管疾患は悪性新生物、心疾患に次ぐ死因であり、その年間死亡数は腎疾患の10倍近く、また罹患後の後遺症は麻痺・運動不能を伴うなど、日常生活に極めて多大な支障を来たす。脳血管疾患の大半を占める脳卒中は早期発見・早期治療が困難な疾患である。また自覚症状を伴わない無症候性脳梗塞は、画像診断により偶然に発見されるケースが大半であり、血液・尿検査等に利用される診断マーカーが存在しないのが現状である。その為、画像診断などの高価な機器を必要としない、簡易で、確度の高い診断方法の開発が望まれている。

ところでポリアミンは生体内において普遍的に見出される生体アミンであり、スペルミン、スペルミジン、スペルミンなどに代表される。そしてそれらのポリアミンは細胞内に高濃度（mMオーダー）に存在し、生体内において核酸と相互作用することにより細胞増殖因子として作用する。一方、ポリアミンはその代謝過程で、細胞にとって毒性の高いアクロレイン（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ ）を産生する。このアクロレインは細胞内ではアルデヒドデヒドロゲナーゼにより無毒化されるが、細胞外に漏出すると強い毒性を示す。

なお、慢性腎不全患者の血漿中にはポリアミンが蓄積していることから、ポリアミンは尿毒素の原因物質の一つであろうとされている。そのうえ、このポリアミンを透析により十分に取り除くことは困難であるといわれている。そこでポリアミンから誘導される毒性の本体を明らかにすることは、尿毒症のより有効な治療薬の開発につながる。

そのような観点から本発明者らは、ポリアミンよりアクロレインを生成する経路において作用しているポリアミンオキシダーゼを、アミノグアニジンを用いて阻害することを試みた。そしてその結果ポリアミンは毒性を示さなくなることが確認されている（特開2002-281999号公報）。組織破壊を伴う疾患においては、細胞内より遊離したポリアミンが血漿中のポリアミンオキシダーゼにより酸化的脱アミノ化を受けてアクロレインが大量に産生し、生成したアクロレインが毒性に関与している可能性が極めて高い。

発明の開示

上記で述べたように腎疾患における尿毒症に、ポリアミンの酸化分解により発生したアクロレインが関与していることは知られていた。しかしそ他の疾患、例えば脳卒中などの脳血管疾患においてアクロレインが関与しているかどうかの知見は不足していた。なお、脳卒中とは脳血管の病的過程により急激に起こる局所精神・神経症状を表すものであり、その原因疾患として重要なものは脳梗塞や脳内出血などが挙げられる。よって本発明の課題は、脳卒中などの脳血管疾患において生体内のポリアミンあるいはアクロレインの含量が量的に変化するか否かを検討することである。脳卒中患者においてアクロレインの量に変化が見られるならば、アクロレインを指標にして脳卒中・無症候性脳梗塞を診断することが可能となる。またポリアミンからアクロレインが生成する過程には血漿中のポリアミンオキシダーゼが関与しているので、脳卒中患者においてポリアミンオキシダーゼの活性及びその蛋白質量が変化しているか否かを検討することも本発明の課題である。

本発明者等は、被験者の血漿中に含まれるアクロレイン含量、ポリアミン含量およびポリアミンオキシダーゼ活性を測定し、脳梗塞・脳内出血の患者群と、健常者群あるいは他の脳疾患の患者群との間に差があるか比較を行なった。その結果、脳梗塞・脳内出血の患者群においては、健常者群あるいは他の脳疾患の患者群と比較して、血漿アクロレイン含量とポリアミンオキシダーゼ活性が明らかに高いことが認められた。その後被験者において磁気共鳴画像診断法（MR I）で頭部断層画像を撮影する事により、血漿アクロレイン含量とポリアミンオキシダーゼ活性が高い被験者では梗塞がある事を確認し、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、脳卒中・無症候性脳梗塞の発見・予知のための診断方法を提供するものである。本発明によれば血漿中のアクロレイン量、ポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼの蛋白質量、ポリアミン量を測定する事により、脳卒中・無症候性脳梗塞の予知、発見をすることができる。

本発明は、血漿中のアクロレイン含有量、ポリアミン含有量、あるいはポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼの蛋白質量の測定を行なうことにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の診断及び、脳卒中・無症候性脳梗塞患者のスクリーニングを行なう方法を提供するものである。本発明の知見は、ポリアミンオキシダーゼを介する酸化的脱アミノ化により生体内ポリアミンからアクロレインを生成する経路を阻害することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞を予防したり、病状の進歩を阻止することができる可能性を示唆するものである。更に本発明の知見は、ポリアミンオキシダーゼを阻害する化合物を探索することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の治療薬を得ることができる可能性をも示唆するものであり、種々の応用が可能であると考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、血漿中のFDP-リジン量を、脳梗塞・脳内出血群と、健常者群及びその他脳疾患群の間で比較したグラフである。

図2は、血漿中のポリアミンオキシダーゼ活性を、脳梗塞・脳内出血群と、健

常者群及びその他脳疾患群の間で比較したグラフである。

図3は、MRIにより頭部の断面画像解析を行った結果を示す写真である。

図4は、頭部の断面画像解析の経時変化をMRIとCTにより検討した写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、ポリアミンの酸化分解により発生するアクロレインが脳梗塞・脳内出血の患者の血清中に多く存在する事を見出した。また脳梗塞・脳内出血の発見・予知に、血漿中のアクロレイン含量、ポリアミン含量およびポリアミンオキシダーゼ活性の上昇を用いることができる事を実証した。

よって本発明は、被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼの蛋白質量を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞を診断する方法である。また本発明は、被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼの蛋白質量を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングする方法である。

本発明においては被験者から、まず測定に使用する生体サンプルを採取する。本発明において使用される生体サンプルは、好ましくは下記の実施例において使用している血漿である。しかし他の生体サンプルも適宜使用することが可能であり、その様な他の生体サンプルとして、例えば尿、唾液、脳脊髄液や骨髓液などを挙げることが可能である。

なお本願明細書においてポリアミンとは、第一級アミノ基を二つ以上もつ直鎖の脂肪族炭化水素を意味するものである。知られている生体ポリアミンには、ブトレッシン、カダベリン、スペルミジン、スペルミン、1,3-ジアミノプロパン、カルジン、ホモスペルミジン、3-アミノプロピルカダベリン、ノルスペルミン、

テルモスペルミン、カルドペンタミンなどがあるが、それらに限定されるものではない。なお本発明において好適なポリアミンはプロレッシン、スペルミジン、スペルミンである。

上記のポリアミンは酸化、アセチル化、アミノ基転移、カルバモイル化による代謝を受けるが、ポリアミンオキシダーゼはポリアミンの酸化に関与する酵素である。なお本願明細書においてポリアミンオキシダーゼとは、ジアミンまたはポリアミンを良い基質として酸化し、過酸化水素を発生する酵素を意味するものである。ポリアミンは、ポリアミンオキシダーゼによる酸化的脱アミノ化を受け、その結果アクロレインなどのアルデヒド体が生成する。なお本発明において好適なアルデヒド体はアクロレインであるが、それに限定されるものではない。

血漿中のアクロレイン含量は、アクロレイン付加アミノ酸である FDP-リジン (N-ホルミルピペリジノ・リジン) の含有量を測定する事により同定することができる。FDP-リジンの含有量は、例えば ACR-LYSINEADDUCT ELISA SYSTEM (日本油脂株式会社) を使用し、添付のマニュアルに従って測定することができる。なおアクロレイン含量は FDP-リジン以外の誘導体の形で測定することも可能である。またアクロレイン含量を直接測定することも可能であり、かかる方法は例えば Alarcon らの報告 (Alarcon R. A. (1968) Anal. Chem. 40, 1704-1708) に記載されている。しかしアクロレインは他の分子との反応性が高いために、遊離の形で血中に存在する量が少ないという問題がある。そこで、FDP-リジンの形で測定することが簡便であることも併せて考えると、本発明において、FDP-リジンの形でアクロレインを測定することは好適な態様である。

具体的には、患者血清及び標準液を抗原固定化プレートに $50 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し、さらに一次反応抗体液を同量加える。室温で 30 分静置した後、液を取り除き、洗浄液で洗浄後、二次反応抗体液を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 分注する。室温で一時間静置後、洗浄液で洗浄し、発色液を加え室温で 15 分静置することで発色させる。プレートリーダーにより、450nm の吸光度測定をすることにより、血漿中アクロレイン量

は、患者血清 1ml 当たりの FDP-リジン含有量 (nmol/ml plasma) として表示される。

ポリアミンオキシダーゼの活性測定は、例えば下記の実施例において示す様に、10mM-Tris 塩酸塩 (pH7.5)、0.2mM の基質 (スペルミン、スペルミジン及びプロトレスシン) 及び 0.03ml の患者血清の反応混合液 0.15ml を 37°Cにて 48 時間インキュベーションすることにより行なうことができる。0.02ml の反応混合液に最終濃度 5 %のトリクロロ酢酸 (TCA) を加え、遠心分離する。得られた上清の一部をポリアミンのアッセイに使用する。アミンオキシダーゼ活性は患者血清 1ml 当たりのスペルミン分解により生成したスペルミジン量 (nmol/ml plasma/48h) で表示することができる。

ポリアミンオキシダーゼの酵素活性測定方法は種々の報告において記載されており、そのような文献として、Sharmin らの報告 (Sharmin et al., (2001) Biochem. Biophys Res. Commun. 282, 228-235)、Sakata らの報告 (Sakata et al., (2003) Biochem. Biophys Res. Commun. 305, 143-149)、Igarashi らの報告 (Igarashi et al., (1986) J. Bacteriol. 166, 128-134) などを挙げることができる。かかる報告の記載を基にして当業者は適宜改変を行うことにより、ポリアミンオキシダーゼの酵素活性を測定することができる。

またポリアミンオキシダーゼの蛋白質量は、例えばポリアミンオキシダーゼに対して特異的な抗体を用いた酵素免疫測定法 (ELISA)、ウエスタンブロッティング解析や免疫沈降法などによって測定することができる。かかる手法は本技術分野において公知の一般的な手法であり、当業者は適切な条件を適宜設定して上記の手法により酵素の蛋白質量を測定する事ができる。なおこれらの測定を行う際に使用されるポリアミンオキシダーゼに対する抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でも良い。

ポリアミンオキシダーゼに対するポリクローナル抗体は、例えば通常のペプチド抗体作製の手法を用いてウサギをポリアミンオキシダーゼのペプチド断片で免

疫することにより、得ることができる。ペプチド抗体が作製された事は、ペプチドを投与されたウサギから採血をしてその抗体価を測定することにより、抗体が十分な力値に達しているか検定を行うことによって確認する事ができる。ペプチド抗体作製の手法は種々の実験書などにも記載されており、当業者に良く知られているので、それらに記載を基に種々の改変を行ってポリアミンオキシダーゼの抗体を得ることができる。

試料に含まれるポリアミンの含有量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定することができる。例えば TOSO から市販されているポリアミンカラムを使用した場合には、ポリアミン類 (プロレッシン、スペルミジン、スペルミン) の HPLC 上のリテンションタイム (保持時間) は各々 7 分、12 分、25 分である。ポリアミン量は患者血清 1 ml 当たりに含まれるプロレスシン、スペルミジン及びスペルミン量 (nmol/ml plasma) で表示することができる。なおその他の通常のアミノ酸カラムも、適宜使用することができる。

下記の実施例においては、被験者の同意の下、磁気共鳴画像診断法 (MR I) により、頭部断層画像を得て梗塞の有無を検討した。その結果下記の実施例に示すように、健常者群において高い値を示した被験者において、脳梗塞の所見が認められた。

よって、脳卒中の患者において血漿中のアクロレイン含量、ポリアミン含量あるいはポリアミンオキシダーゼ活性は健常者と比較して高いという本発明の知見を利用して、上記の測定値を指標として、脳卒中・無症候性脳梗塞を診断することができる。また本発明において得られた知見を利用して、上記の測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングすることもできる。例えば健常者群の上記の指標となる測定値の平均値と分散を統計学的に解析し、上記測定値における正常値の上限を設定する。その値を基にして、より高い値を示す被験者は脳卒中・無症候性脳梗塞である可能性が高いと診断することも可能であろう。

また本発明の知見は、血漿中のポリアミンオキシダーゼ活性を阻害することにより生体におけるアクロレインの生成を抑制することにより、脳卒中の予防や病状の進歩を阻止することができる可能性も示唆するものである。よって本発明は、脳卒中の治療に関する新たな途を開く可能性を提供するものである。

更に、脳卒中の治療に有効である可能性がある候補化合物を実験動物に投与し、該化合物が該実験動物において血漿中のポリアミンオキシダーゼを阻害する活性を有するかを測定することにより、脳卒中の治療に有効である新たな薬剤を探索できると考えられる。よって本発明は、脳卒中の治療に有効な新たな薬剤を探索するための新たな途をも提供するものである。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1：脳梗塞患者に於ける血漿アクロレイン含有量の比較検討

脳疾患患者における血漿アクロレイン含有量を検討した。健常人、脳梗塞・脳内出血群、その他脳疾患群の3群に分けて、採取した血液のアクロレイン含有量を比較した。

血漿中アクロレイン量は、アクロレイン付加アミノ酸である FDP-リジン (N-ホルミルピペリジノ・リジン) の含有量を測定する事で同定した。ACR-LYSINE ADDUCTELISA SYSTEM(日本油脂株式会社)を用い、添付のマニュアルに従って測定した。患者血清及び標準液を抗原固定化プレートに $50 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ分注し、更に一次反応抗体液を同量加えた。室温で 30 分静置後、液を取り除き、洗浄液で洗浄し、発色液を加え室温で 15 分静置することで発色させた。プレートリーダーにより、450nm の吸光度測定をした。血漿中アクロレイン量は患者血清 1ml 当たりの FDP-リジン含有量(nmol/ml plasma)で表示した。

図 1 に示されるように血漿アクロレイン量を反映する FDP-リジン量は、上記の 3 群の中で脳梗塞・脳内出血患者が最も高く、他の群に比べ有意に上昇が見られ

た。また慢性腎不全患者の血漿中アクロレイン量と比較しても、脳梗塞患者のFDP-リジン量は、腎不全患者と同等レベルまで上昇している事が判明した。

実施例 2：脳梗塞患者における血漿アミノオキシダーゼ活性の比較検討

実施例 1 で用いた患者血漿中のポリアミノオキシダーゼ活性を測定した。その結果を図 2 に示す。血漿中のポリアミノオキシダーゼの活性は、10mM-Tris 塩酸塩 (pH7.5)、0.2mM の基質 (スペルミン、スペルミジン及びプロレスシン) 及び 0.03ml の患者血清の反応混合液 0.15ml を 37°C にて 48 時間インキュベーションすることにより測定した。0.02ml の反応混合液に最終濃度 5% のトリクロロ酢酸 (TCA) を加え、遠心分離した。得られた上清の一部をポリアミンのアッセイに使用した。アミノオキシダーゼ活性は患者血清 1ml 当たりの、スペルミン分解により生成したスペルミジン量 (nmol/ml plasma/48h) で表示した。

脳梗塞・脳内出血群の血漿中のポリアミノオキシダーゼ活性は、健常者群及びその他脳疾患群と比較して有意に上昇していた。この結果は、実施例 1 で比較検討した血漿中アクロレイン量と相関性を有していた。

実施例 3：磁気共鳴画像診断法 (MRI) による頭部断面画像解析

被験者の許可・同意を得て、MRI により頭部の断面画像解析を行い、脳梗塞の有無を調べた。健常者 (図 3 A)、脳梗塞患者 (図 3 B)、および病名の診断はついていないが血漿中のアクロレイン量とポリアミノオキシダーゼ活性が極めて高い値を示した被験者 (図 3 C) における MRI 断層写真を示す。図 3 C に示されるように、血漿中のアクロレイン量とポリアミノオキシダーゼ活性が高かった患者では、両側前頭・側頭頂および基底核に多発性の梗塞が認められた。また脳の萎縮および動脈硬化も認められた。

実施例 4：急性期脳梗塞患者における頭部断面画像、血漿ポリアミノオキシダーゼ活性およびアクロレイン含有量の変化についての比較検討

急性期脳梗塞患者 1 名について、発症当日 (1 日)、2 日目および一週間後 (7 日) における頭部断面画像 (MRI, CT) の変化と、それに伴う血漿ポリアミノオキ

シダーゼ活性およびアクロレイン含有量の変化を調べた。頭部断面画像の写真を図4に示す。発症当日では、T2強調MRIおよびCTに明瞭な梗塞像は見られなかった。一方発症当日の血漿ポリアミンオキシダーゼ活性とFDP-Lys量は、それぞれ6.6nmol SPD增加/ml 血漿と18.4nmol/ml 血漿であった。この結果から、血漿ポリアミンオキシダーゼ活性は健常者群の2倍程度であり、有意に高値であることが確認された。発症2日目の頭部断面画像(MRI)と一週間後の頭部断面画像(CT)では、左側頭葉に明瞭な梗塞像が認められた。発症一週間後の血漿ポリアミンオキシダーゼ活性とFDP-Lys量は、それぞれ7.2nmol SPD增加/ml 血漿と23.0nmol/ml 血漿であった。よって血漿ポリアミンオキシダーゼ活性の上昇と共に、血漿アクロレイン含有量の有意な増加も認められた。以上に示されるように、急性期梗塞患者においては血漿ポリアミンオキシダーゼ活性の上昇が、MRIもしくはCTにおける梗塞像の出現に先立って起こることが確認された。

産業上の利用可能性

血漿中のアクロレイン含有量、ポリアミン含有量、あるいはポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼ蛋白質量の測定を行なうことからなる本発明の方法は、脳卒中・無症候性脳梗塞の診断、及び、脳卒中・無症候性脳梗塞患者のスクリーニングに有用である。また本発明の知見を利用して、ポリアミンオキシダーゼを介する酸化的脱アミノ化により生体内ポリアミンからアクロレインを生成する経路を阻害することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞を予防したり、病状の進歩を阻止することができる可能性がある。更に本発明の知見を利用して、ポリアミンオキシダーゼを阻害する化合物を探索することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の治療薬を得ることができる可能性がある。

請 求 の 範 囲

1. 被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼの蛋白質量を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞を診断する過程からなる、脳卒中・無症候性脳梗塞の診断方法。
2. 前記ポリアミンがスペルミン、スペルミジンまたはプロレッシンである、請求項1記載の方法。
3. ポリアミンから生成される前記アルデヒド体がアクロレインである、請求項1記載の方法。
4. 被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性又はポリアミンオキシダーゼの蛋白質量を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングする過程からなる、脳卒中・無症候性脳梗塞の患者のスクリーニング方法。
5. 前記ポリアミンがスペルミン、スペルミジンまたはプロレッシンである、請求項4記載の方法。
6. ポリアミンから生成される前記アルデヒド体がアクロレインである、請求項4記載の方法。
7. 被験者から採取した生体サンプルにおける前記ポリアミンオキシダーゼ活性又は前記ポリアミンオキシダーゼの蛋白質量の統計学的に有意な変化が、該被験者において撮影した頭部診断画像で脳卒中・無症候性脳梗塞の兆候ないしは発症に特徴的な像が認められる前に起こることを特徴とする、請求項1から請求項3のいずれか一つ請求項記載の方法。

8. 被験者から採取した生体サンプルにおける前記ポリアミンオキシダーゼ活性又は前記ポリアミンオキシダーゼの蛋白質量の統計学的に有意な変化が、該被験者において撮影した頭部診断画像で脳卒中・無症候性脳梗塞の兆候ないしは発症に特徴的な像が認められる前に起こることを特徴とする、請求項4から請求項6のいずれか一つ請求項記載の方法。

FIG. 1

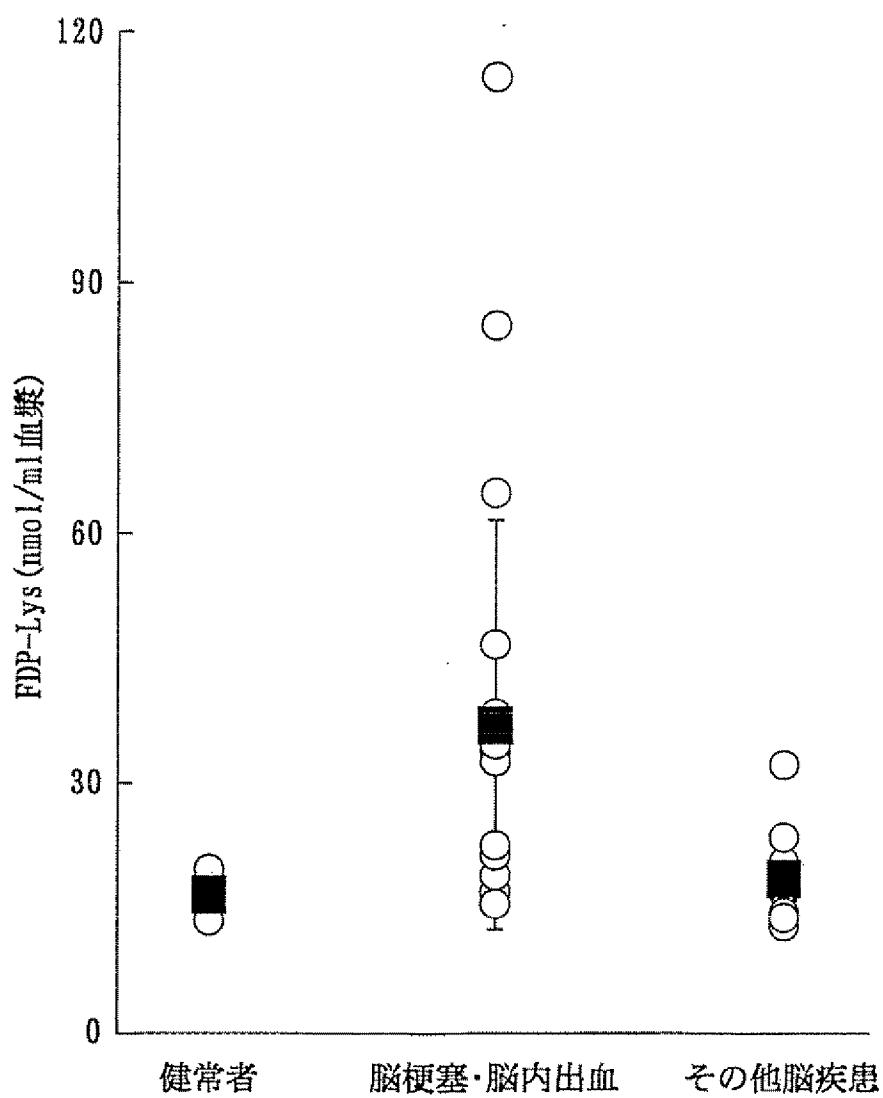


FIG. 2

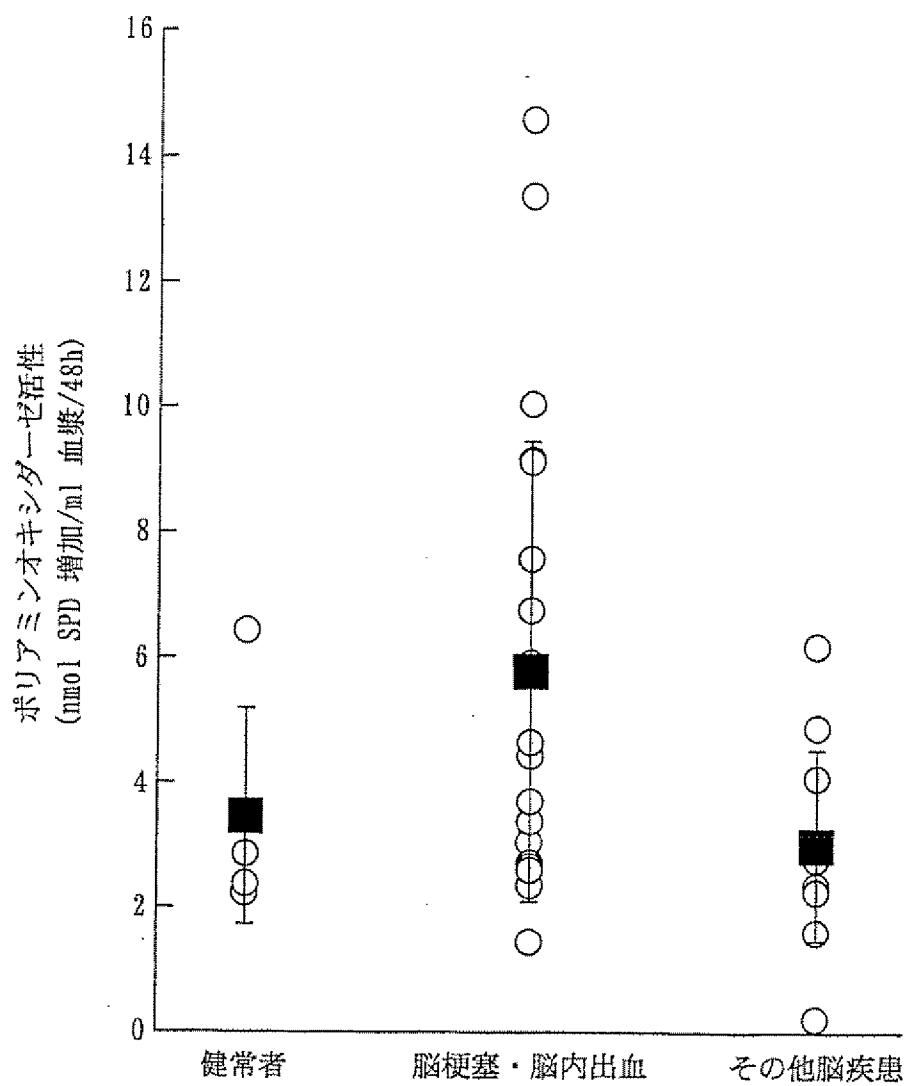
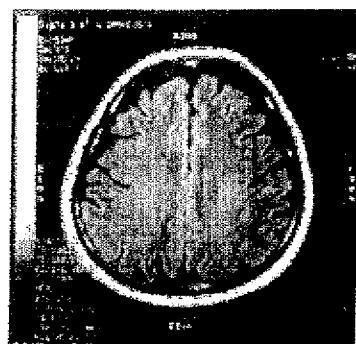
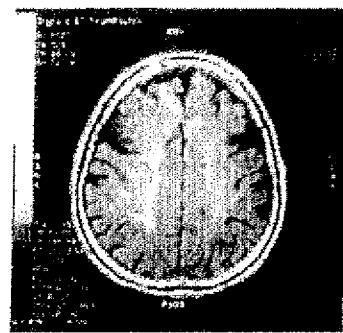


FIG. 3

A



B



C

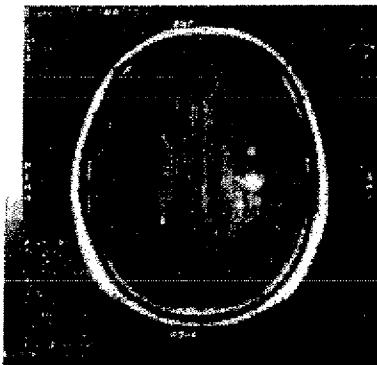
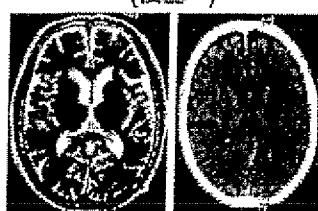


FIG. 4

発症後経過日数	1日 (梗塞 -)	2日 (梗塞 +)	7日 (梗塞 +)
			
	MRI	CT	MRI

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/50, C12Q1/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/50, C12Q1/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y	JP 2002-520360 A (THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH), 09 July, 2002 (09.07.02), Par. Nos. [0002] to [0003], [0013] to [0014], [0032] to [0040]; examples & DE 69924379 A & EP 1098647 A & US 6391899 A & WO 2000/003711 A	1, 2, 4, 5, 7, 8/ 3, 6
Y/ A	JP 2002-281999 A (Kazuhiro IGARASHI), 02 October, 2002 (02.10.02), Test 2 (Family: none)	3, 6/ 1, 2, 4, 5, 7, 8
Y	JP 2002-181820 A (Ikagaku Co., Ltd.), 26 June, 2002 (26.06.02), Claims; Par. No. [0002] (Family: none)	3, 6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 June, 2005 (13.06.05)Date of mailing of the international search report
28 June, 2005 (28.06.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006429

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-541162 A (Nosu Shoa-rongu Airando juisshu Risachi Insutituto), 03 December, 2002 (03.12.02), Examples 1, 2 & EP 1191845 A & WO 2000/060943 A	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	US 5733933 B (Richard J. Bucala), 31 March, 1998 (31.03.98), & DE 68909062 A & EP 0175764 A & JP 1163168 A & WO 85/04169 A	1-8

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl⁷ G01N33/50, C12Q1/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl⁷ G01N33/50, C12Q1/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Caplus(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ Y	JP 2002-520360 A (ザ ピコワ インスティテュート フォーメ ディカル リサーチ) 2002.07.09, 【0002】-【0003】、【0013】-【0014】、 【0032】-【0040】、実施例等参照 & DE 69924379 A & EP 1098647 A & US 6391899 A & WO 2000/003711 A	1, 2, 4, 5, 7, 8/ 3, 6
Y/ A	JP 2002-281999 A (五十嵐一衛) 2002.10.02, 試験2 (ファミリーなし)	3, 6/ 1, 2, 4, 5, 7, 8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 13.06.2005	国際調査報告の発送日 28.06.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 加々美 一恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3252 2 J 9408

C(続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-181820 A (株式会社いかがく) 2002.06.26, 特許請求の範囲、【0002】 (ファミリーなし)	3, 6
X	JP 2002-541162 A (ノース・ショアーロング・アイランド・ジャージッシュ・リサーチ・インスティテュート) 2002.12.03, 実施例 1, 2 & EP 1191845 A & WO 2000/060943 A	1, 2, 4, 5, 7, 8
A	US 5733933 B (Richard J. Bucala) 1998.03.31 & DE 68909062A & EP 0175764 A & JP 1163168 A & WO 85/04169 A	1-8